



## **Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.)**

**Carmona, Juan E.; Morales-Martínez, Thelma K.; Mussatto, Solange I.; Castillo-Quiroz, David; Ríos-González, Leopoldo J.**

*Published in:*  
Revista Mexicana de Ciencias Forestales

*Publication date:*  
2017

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*  
Carmona, J. E., Morales-Martínez, T. K., Mussatto, S. I., Castillo-Quiroz, D., & Ríos-González, L. J. (2017). Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(42), 100-122. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v8n42/2007-1132-remcf-8-42-00100.pdf>

---

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

# Revista Mexicana de Ciencias Forestales

**Vol. 8 Núm. 42 2017**

Competencia alimentaria entre el venado cola blanca y tres herbívoros exóticos en el noreste de Tamaulipas, México  
Food competition between the White-tailed deer and three exotic herbivorous species in Northeast Tamaulipas, Mexico

Evaluación del potencial dendroclimático de *Pinus lumholzii* B. L. Rob. & Fernald  
Assessment of the dendroclimatic potential of *Pinus lumholzii* B. L. Rob. & Fernald

Calidad de planta y supervivencia en reforestación de *Pinus montezumae* Lamb.  
Plant quality and survival in *Pinus montezumae* Lamb. reforestation

Caracterización morfológica de *Simmondsia chinensis* (Link.) C. K. Schneid. en condiciones de riego  
Morphological characterization of *Simmondsia chinensis* (Link.) C. K. Schneid. under irrigation conditions

Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.)  
Chemical, structural and functional properties of *lechuguilla* (*Agave lechuguilla* Torr.)

Respiración del suelo en cuatro sistemas de uso de la tierra  
Soil breathing in four land use systems

Susceptibilidad y prevalencia de *Eucalyptus pellita* F. Muell. al cancro causado por *Chrysosporium cubensis* (Bruner)

Gryzenhout & M. J. Wingf. en la Orinoquia Colombiana  
Susceptibility and prevalence of *Eucalyptus pellita* F. Muell. to the cancer caused by *Chrysosporium cubensis* (Bruner)  
Gryzenhout & M. J. Wingf in the Colombian Orinoquia

Revista Mexicana de Ciencias Forestales Vol. 8 Núm. 42 julio-agosto 2017



**iniqap**

Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Rev. Mex. Cien. For. Vol. 8 Núm. 42 julio-agosto 2017 ISSN: 2448-6671



## **Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.)**

Juan E. Carmona<sup>1</sup>

Thelma K. Morales-Martínez<sup>1</sup>

Solange I. Mussatto<sup>2</sup>

David Castillo-Quiroz<sup>3</sup>

Leopoldo J. Ríos-González<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. México.

<sup>2</sup> Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Technical University of Denmark, Kemitorvet, Building 220, 2800, Kongens Lyngby, Denmark.

<sup>3</sup> Campo Experimental Saltillo, CIRNE, INIFAP. México.

\* Autor por correspondencia, email: leopoldo.rios@uadec.edu.mx



**Resumen:**

*Agave lechuguilla* es un recurso forestal no maderable de las zonas áridas y semiáridas del noreste de México; por el área de distribución que ocupa, resulta interesante evaluar el potencial de esta materia prima para aplicaciones biotecnológicas como la producción de biocombustibles de segunda generación y productos químicos con alto valor agregado en beneficio de los productores del área rural. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las propiedades químicas, estructurales y funcionales de la biomasa de *A. lechuguilla*, que permitan determinar su potencial para la obtención de antioxidantes como productos de alto valor agregado. El estudio del material por Espectrometría Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR) y por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) confirmaron las características comunes de los compuestos lignocelulósicos de este tipo de materiales. De acuerdo a la caracterización química, los principales componentes fueron los compuestos extractivos (45.34 %), seguidos de los azúcares estructurales: celulosa y hemicelulosa (34.87 %) y lignina total de 7.32 %. Se evaluó el efecto de diferentes solventes (metanol, etanol y acetona) con NaOH en la obtención de extractos antioxidantes. Todos los extractos mostraron actividad antioxidante (ensayos DPPH, FRAP y CAT), con una mejor afinidad para su extracción y preservación con la acetona (89.75 % por DPPH; 1.60 mM Fe(II) g<sup>-1</sup> de biomasa por FRAP y 1.75 mg  $\alpha$ -tocoferol g<sup>-1</sup> de biomasa por CAT). Los resultados revelan el potencial de *A. lechuguilla* para la extracción de antioxidantes como productos de interés en la industria farmacéutica y alimentaria.

**Palabras clave:** *Agave lechuguilla* Torr., antioxidantes, características estructurales, composición química, propiedades funcionales.

Fecha de recepción/ Reception date: 10 de abril de 2017.

Fecha de aceptación/ Acceptance date: 6 de mayo de 2017.

## Introducción

Diferentes especies de agave han mostrado, *in vitro* e *in vivo*, actividad antimicrobiana y antifúngica (García *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2005; Verástegui *et al.*, 2008; De Rodríguez *et al.*, 2011), antiinflamatoria (Peana *et al.*, 1997; García *et al.*, 2000), antioxidante (Singh *et al.*, 2003; Ben Hamissa *et al.*, 2012), molusquicida (Brackenbury y Appleton, 1997; Abdel-Gawad *et al.*, 1999), antidiabética (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005) y actividad citotóxica contra algunas líneas de célula cancerígena (Yokosuka y Mimaki, 2009; Man *et al.*, 2010; Podolak *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Estas propiedades son atribuidas a ciertos fitoquímicos como saponinas, sapogeninas, compuestos fenólicos y fructanos. Además de las propiedades benéficas citadas, las saponinas de diferentes plantas son antiparasitarias, antivirales, cicatrizantes de heridas, antioxidantes, antiulcerogénicas, inmunomoduladores, hepatoprotectoras, neuroprotectoras, antimutagénicas, antiespasmódicas, hipolipemiantes y con actividades hipocolesterolémicas (Sparg *et al.*, 2004).

Adicionalmente, la hidrólisis de fructanos podría ser una fuente de oligosacáridos prebióticos (Ávila-Fernández *et al.*, 2011) y monosacáridos como glucosa y fructosa. Debido a que los fructanos son la principal reserva de carbohidratos solubles en agua de los agaves, su contenido representa el principal componente de varias especies (35 % a 70 % base peso seco) y dado que su hidrólisis libera de 80 % a 86 % de fructosa y de 10 % a 15 % de glucosa, son usados para la producción de jarabes, la cual es una de las aplicaciones más recientes de estas plantas (Escamilla-Treviño, 2012).

A pesar de que las hojas frescas representan alrededor de 25 % de la planta (base húmeda), ese material no se utiliza (Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001), ya que su contenido de azúcares no estructurales es inferior, comparado con la parte central

del individuo, conocida tradicionalmente como cabeza o piña; sin embargo, es factible usar las hojas para la extracción de fibras, papel o la producción de biocombustibles, como el etanol (Idarraga *et al.*, 1999; Narvaéz-Zapata y Sánchez-Teyer, 2009; de Paula *et al.*, 2012).

La lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr., Asparagaceae) (Tropicos, 2017) es un recurso forestal no maderable, es un taxa nativo de las zonas áridas y semiáridas del sur de los Estados Unidos de América y del noreste de México (Castillo *et al.*, 2011). Su área de distribución nacional cubre una superficie aproximada de 20 millones de hectáreas, comprende los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas (Castillo *et al.*, 2011).

*A. lechuguilla* aporta importantes beneficios socioeconómicos a los pobladores del área rural, ya que la extracción de su fibra ha constituido una actividad de subsistencia familiar por más de 70 años y representa empleos directos (Castillo *et al.*, 2013); además de, las ventajas que significa la comercialización de la materia prima que de ella se obtiene (Castillo *et al.*, 2011), cuya transformación origina diversos productos, como cepillos para uso industrial y doméstico, entre otros; su mercado fundamental es el internacional, de tal manera que 93 % de su producción se exporta, principalmente a los Estados Unidos de América, los Países Bajos, Suiza y Honduras (Castillo *et al.*, 2011), naciones donde México es el único exportador.

Tradicionalmente, la fibra de lechuguilla se obtiene del cogollo, al cual lo integran las hojas más tiernas de la planta, agrupadas en su porción central (Castillo *et al.*, 2005; Narcia *et al.*, 2012); esta fibra tiene menor lignificación, en comparación con la de las hojas laterales. En la actualidad, su aprovechamiento en el campo está relacionado con altos índices de marginación, por ello es necesario buscar nuevas alternativas a la extracción de fibra, como la obtención de productos químicos con valor agregado y que sería una oportunidad de mejoramiento de la calidad de vida de los pobladores de las zonas áridas y semiáridas, donde se desarrolla esta especie.

Dada la escasa información sobre su aprovechamiento para aplicaciones biotecnológicas (Hernández *et al.*, 2005; Almaraz-Abarca *et al.*, 2013), el objetivo de la presente investigación fue evaluar las propiedades químicas, estructurales y funcionales de la biomasa de *Agave lechuguilla* que permitan determinar su potencial para la extracción de antioxidantes, como productos químicos de alto valor agregado.

## **Material y Métodos**

### **Recolección de la materia prima y preparación de muestras**

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SEMARNAT-1996 que limita el aprovechamiento del cogollo de *Agave lechuguilla* Torr., la recolección de las muestras de las poblaciones naturales se llevó a cabo durante el mes de marzo en el ejido Paredón del municipio Ramos Arizpe, Coahuila, México (25°55'47" N 101°55'47" O), ubicado a una altitud de 728 m, con 33 °C de temperatura media anual, y 269 mm de precipitación media anual. Su clima corresponde a muy seco o árido, con invierno fresco (García, 1973), su tipo de vegetación es un matorral desértico rosetófilo (Marroquín *et al.*, 1981).

Las muestras recolectadas se lavaron con agua de grifo para eliminar tierra e impurezas. Una vez secas, se recortaron manualmente a una dimensión de aproximadamente 1- 2 cm<sup>2</sup>, y colocaron en un horno de convección *Koleff-KL10* hasta alcanzar una humedad <10 % (p/p). Las muestras deshidratadas fueron molidas en un molino de corte *Retsch-SM100* a un tamaño de partícula promedio de 2 mm. La muestra obtenida se homogenizó y almacenó en contenedores de plástico, a temperatura ambiente.

## **Determinación de la composición química**

La determinación de extractivos se realizó de acuerdo a Sluiter *et al.* (2008), con agua ultrapura y etanol absoluto como disolventes en dos etapas secuenciales. La de celulosa, hemicelulosa y lignina se hizo con base en los procedimientos del Laboratorio Nacional de Energías Renovables (Sluiter *et al.*, 2012), con una modificación (Mussatto *et al.*, 2011): 500 mg del material se hidrolizó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 % (p/p), durante 7 minutos a 50 °C. Subsecuentemente, el hidrolizado se diluyó a 4 % (p/p) con agua destilada. Una segunda hidrólisis se efectuó autoclavando la mezcla de reacción, a 121 °C durante 1 h; la solución resultante se filtró a través de filtros de 0.2-µm, y la fracción líquida fue analizada por HPLC para la determinación de glucosa (celulosa), arabinosa, manosa, galactosa y xilosa (hemicelulosa), de acuerdo a Mussatto y Roberto (2006).

El contenido de lignina ácido soluble (libre de cenizas), se calculó según lo descrito por Mussatto y Roberto (2006). La fracción sólida recuperada después de la filtración se considera lignina ácido insoluble. El valor de lignina total se obtuvo de la suma de lignina insoluble y soluble.

El contenido de cenizas se estimó por incineración de las muestras a 550 °C, durante 4 h (Horwitz y Latimer, 2005).

## **Potencial antioxidante**

Los extractos de *A. lechuguilla* (licores) se obtuvieron utilizando 2 gramos (base seca) de muestra con 40 mL de cada disolvente: 1) metanol, 2) etanol y 3) acetona al 60 % (v/v) para los tres casos. Cada tratamiento se llevó a cabo a un intervalo de temperatura de 60 a 65 °C, durante 90 min con agitación magnética. El



control, consistió en la misma cantidad de muestra sometida a tratamiento con 40 mL de NaOH al 2 %, en una autoclave a 120 °C por 90 min. Después de este tiempo, los cuatro extractos se separaron por centrifugación a 2 500 rpm durante 20 min y fueron filtrados a través de filtros de 0.22 µm.

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó por dos métodos espectrofotométricos: el ensayo de radical libre estable (DPPH) y el ensayo de poder reductor (FRAP), fueron adaptados para una microplaca de 96 orificios (Martins *et al.*, 2012). La capacidad antioxidante total (CAT) se evaluó mediante el método descrito por Prieto *et al.* (1999).

### **Caracterización estructural**

Los espectros FTIR se registraron con el espectrómetro FTIR (Agilent, Cary 630, EE.UU.); los FTIR en el modo de banda de absorción en el intervalo de 650-4 000  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y 32 exploraciones. Consecutivamente, los espectros FTIR resultantes se analizaron, normalizaron y se representaron en el *software Origin* (OriginLab®, 2016).

### **Morfología superficial**

Las partículas de *A. lechuguilla* se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), con un microscopio con cañón de emisión de campo de fuente de electrones de ultra alta resolución (Nova 200 Nano SEM, FEI Company). Previo a los análisis, las muestras se cubrieron con una película delgada (35 nm) de Au-Pd (80-20 % en peso). Las imágenes se obtuvieron aplicando una tensión de aceleración de 10 kV, con aumentos de 200 y 2 000.

## **Análisis**

Todos los experimentos se hicieron por triplicado y los valores registrados representan la media de cada tratamiento, con su desviación estándar correspondiente.

## **Resultados y Discusión**

### **Grupos Químicos y Disposición de Vinculación de los Componentes**

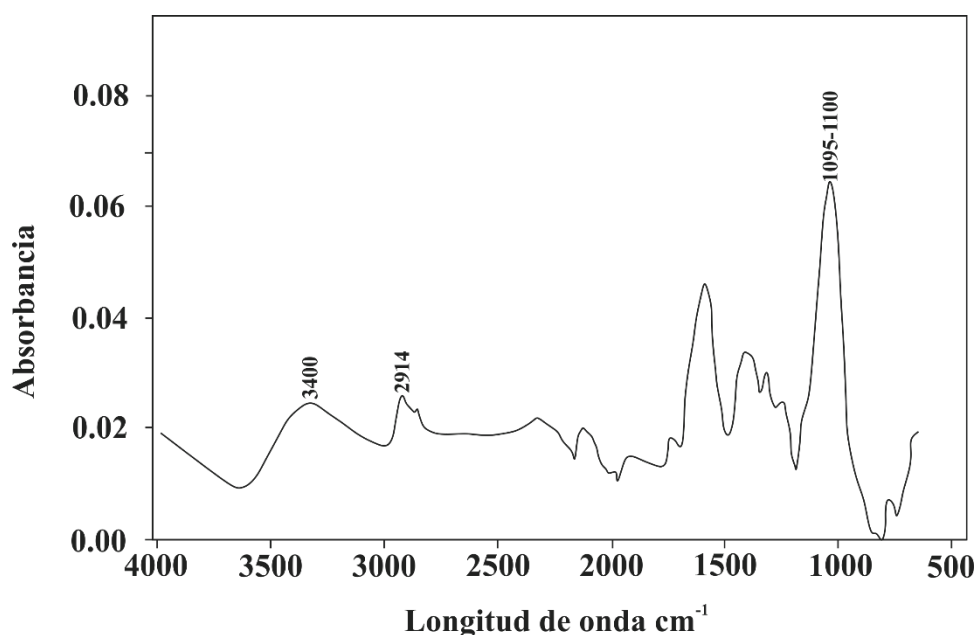
Los análisis FTIR confirmaron que los cogollos de *A. lechuguilla* tienen bandas de absorción típicas de materiales lignocelulósicos; aunque sus magnitudes difieren (Adel *et al.*, 2010).

Dada su naturaleza compleja, sus espectros FTIR suelen estar separados en dos secciones principales; -OH y -CH que se extienden en la región de 3 800-2 700  $\text{cm}^{-1}$ , y la región de huella digital que se asigna a las vibraciones de estiramiento de diferentes grupos de componentes de estos materiales lignocelulósicos a 1 800-800  $\text{cm}^{-1}$  (Poletto *et al.*, 2012).

El pico amplio entre 3400  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con el grupo hidroxilo de la vibración de estiramiento de O-H. Las señales entre 2 920  $\text{cm}^{-1}$  y 2 850  $\text{cm}^{-1}$  se observan, comúnmente, en muestras de biomasa lignocelulósica y corresponden a grupos metil y metileno (-CH<sub>3</sub> y -CH<sub>4</sub>), respectivamente; sin embargo, para muestras *A. lechuguilla* esas señales aparecieron en 2 914  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual es atribuible al mayor contenido extractivo de esta materia prima, ya que algunos compuestos en

extractivos orgánicos, como ésteres metílicos de ácidos grasos y ésteres metílicos de ácido fenólico, contienen grupos metil y metileno (Poletto *et al.*, 2012).

Las señales registradas en  $1\,735\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,375\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,240\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,165\text{ cm}^{-1}$  y  $1\,060\text{ cm}^{-1}$  son características del estiramiento y torsión de diferentes grupos de carbohidratos. Para las bandas de *A. lechuguilla* atribuibles al estiramiento simétrico y asimétrico del C-O-C en enlaces glucosídicos, se presentaron a  $1\,100\text{ cm}^{-1}$  y  $1\,095\text{ cm}^{-1}$  y corresponden a los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos que unen unidades de la glucosa en celulosa y hemicelulosa (Figura 1).

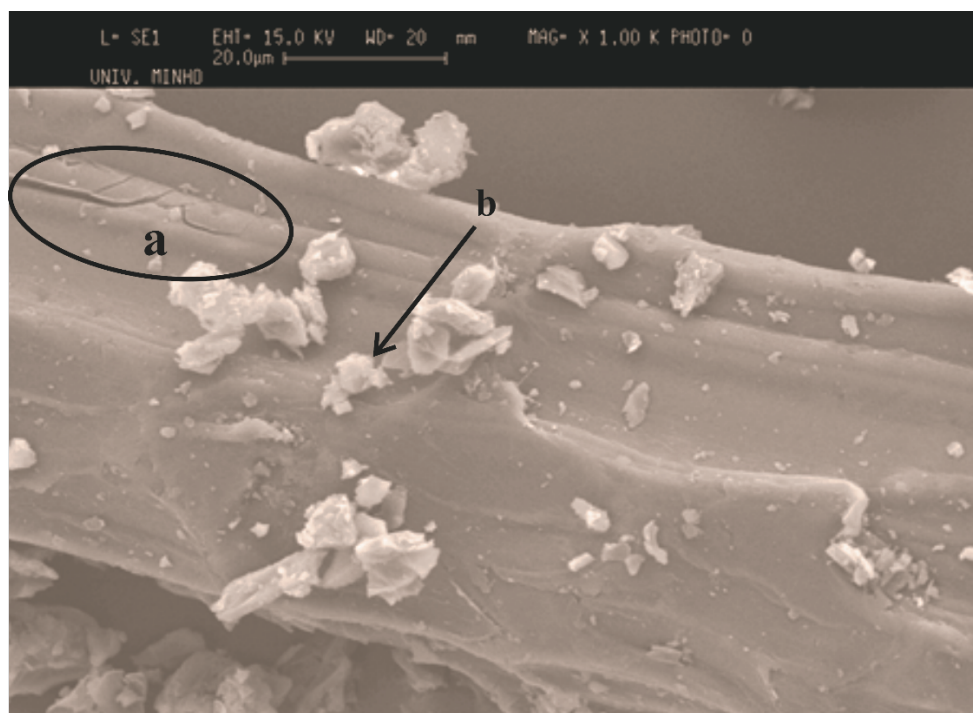


**Figura 1.** Espectro FTIR del cogollo de *Agave lechuguilla* Torr.

## Morfología superficial

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido revelaron una estructura rígida en *A. lechuguilla* (Figura 2). Las pequeñas fracturas observadas pueden atribuirse al proceso de la molienda (Figura 2a), y las pequeñas formas

cristalinas (Figura 2b) serían pequeños cristales de oxalato de calcio, comúnmente, presentes en este tipo de biomasa (Pérez-Pimienta *et al.*, 2016).



a) Fracturas de las fibras; b) Formas cristalinas presentes en el material.

**Figura 2.** Micrografías por microscopía electrónica de barrido (SEM) de hojas molidas de *Agave lechuguilla* Torr.

## Composición química

Después de la eliminación de los compuestos extractivos, el material perdió 45.34 % de su peso original, que corresponde a componentes no estructurales como la sacarosa, nitrato/nitritos, proteína, ceniza, clorofila y compuestos grasos propios de la planta (Sluiter *et al.*, 2012).

La humedad relativa del material, posterior al proceso de secado, fue de 4.33 %. La fracción de celulosa se calculó con base en la glucosa detectada por HPLC

(0.55 g L<sup>-1</sup>), la hemicelulosa se determinó a partir de la concentración de xilosa (0.22 g L<sup>-1</sup>), galactosa (0.18 g L<sup>-1</sup>), arabinosa (0.068 g L<sup>-1</sup>) y manosa (0.08 g L<sup>-1</sup>). El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina total (base seca) en las muestras fueron de 17.72 %, 17.15 y 7.32 %, respectivamente (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Composición química de *Agave lechuguilla* Torr.

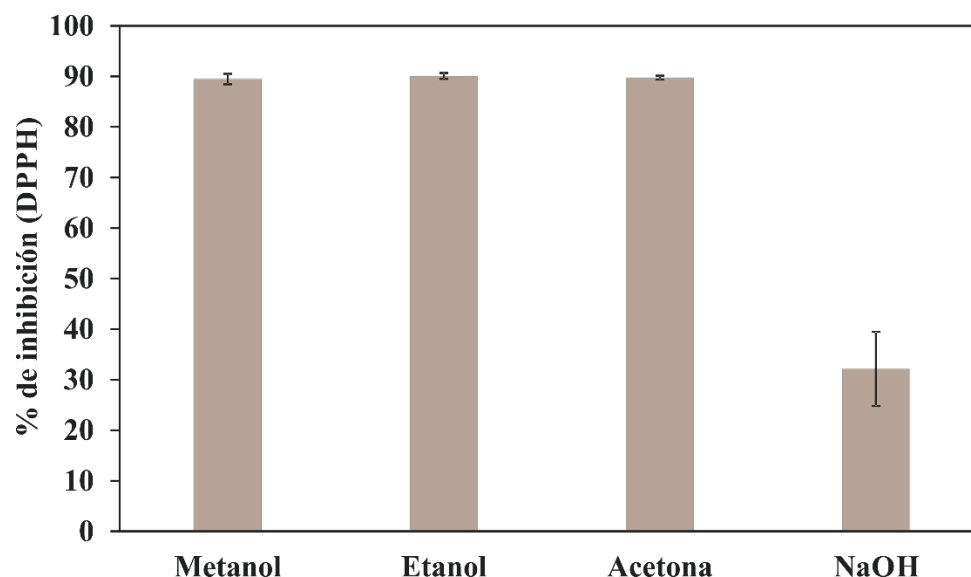
<b>Componente Químico</b>	<b>Composición (% base seca)</b>
Celulosa	17.72 ± 0.68
Hemicelulosa	17.15 ± 0.91
Lignina soluble	3.64 ± 0.34
Lignina insoluble	3.68 ± 0.21
Cenizas	12.45 ± 0.88
Extractivos	45.34 ± 1.2

### **Potencial antioxidante**

El potencial antioxidante de *A. lechuguilla* se evaluó utilizando tres de los métodos más comunes de ensayo (DPPH, FRAP y CAT). El DPPH ha sido ampliamente utilizado como un parámetro rápido, confiable y reproducible para medir la capacidad antioxidante *in vitro* de compuestos puros, así como extractos de plantas (Burda y Oleszek, 2001; Ara y Nur, 2009). Los resultados del ensayo DPPH se presentan en la Figura 3; los valores se proporcionan en términos de % de inhibición por DPPH. Se evidencia que los tratamientos con soluciones de metanol, etanol y acetona fueron del orden de 89.47 %, 90.09 % y 89.75 %, respectivamente.



respectivamente; mientras que, el licor proveniente del tratamiento con NaOH tuvo un valor de DPPH bajo (32.148 %) (Figura 3).

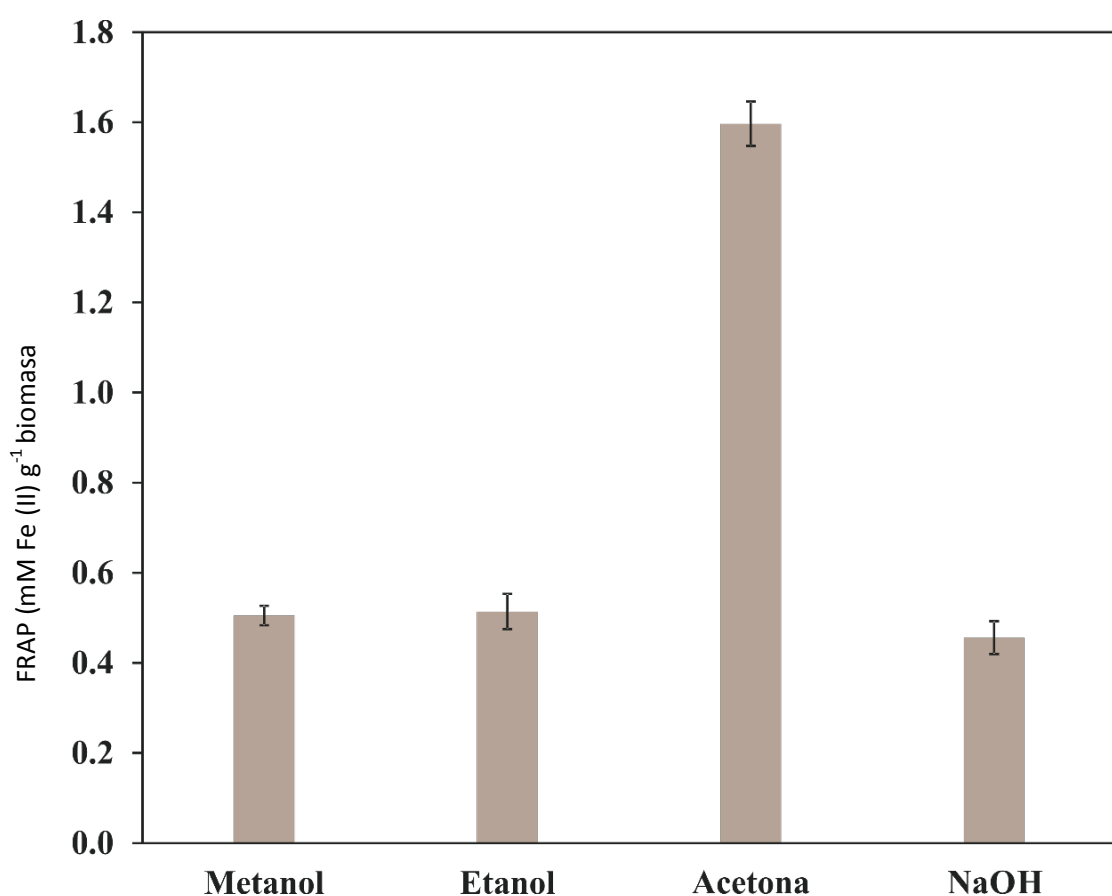


**Figura 3.** Porcentaje de inhibición por reactivo DPPH de diferentes extractos de *Agave lechuguilla* Torr.

Los resultados obtenidos expresados en mM Fe(II) g<sup>-1</sup> biomasa (base seca) fueron de 0.51, 0.51, 1.6 y 0.46, respectivamente, para los extractos obtenidos mediante los tratamientos con metanol, etanol, acetona y NaOH respectivamente.

A pesar de que las soluciones que se utilizaron en los tratamientos son mezclas binarias agua-solvente, no todas presentan las mismas características fisicoquímicas, ya que la polaridad propia de cada solvente (o mezcla de ellos) tiene una relación directa con la cantidad y calidad de compuestos antioxidantes que pueden ser extraídos por el mismo (Aliyu *et al.*, 2012). El orden de jerarquía en cuanto a polaridad para este trabajo es Acetona > Metanol > Etanol. Lo anterior se relaciona con la concentración de antioxidantes detectada por el método FRAP en los licores resultantes de las extracciones con solventes, ya que la concentración mayor resultó con el método con acetona (1.60 mM Fe(II) g<sup>-1</sup> de biomasa), y los

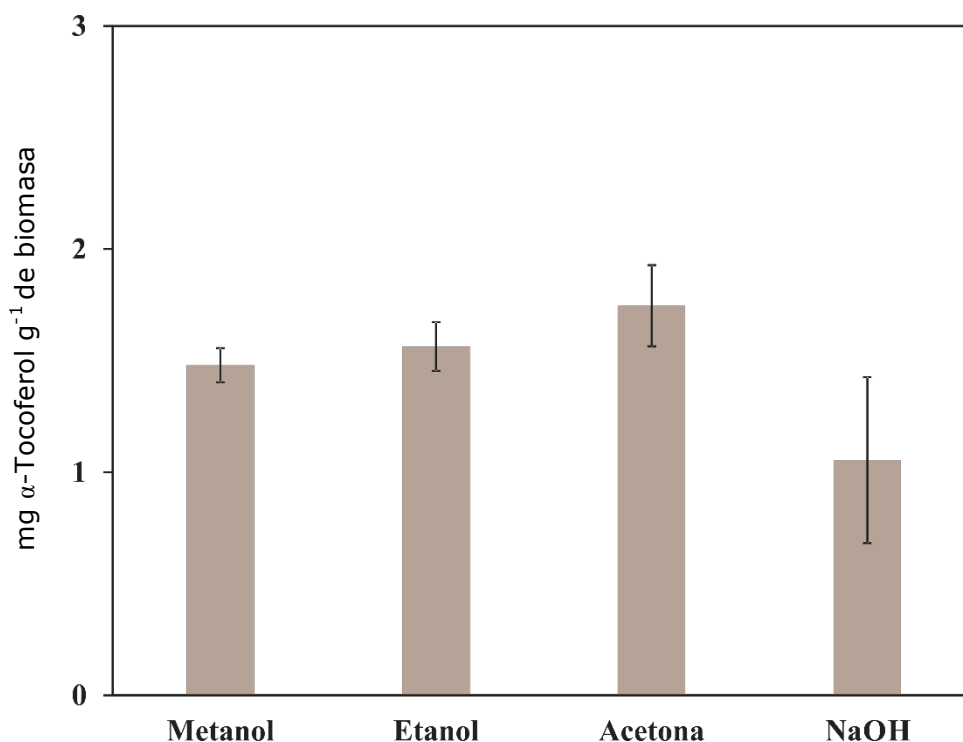
valores de los licores obtenidos con metanol y etanol fueron de 0.51 mM Fe(II) g<sup>-1</sup> de biomasa, ambos presentan una polaridad muy similar. Por último, el valor de 0.46 mM Fe(II) g<sup>-1</sup> de biomasa en el tratamiento con NaOH, responde, no obstante, a no usar ningún solvente para su extracción, la interacción de la temperatura utilizada y el agua presente en la solución lograron extraer una fracción de compuestos antioxidantes.



**Figura 4.** Capacidad antioxidante de diferentes extractos de *Agave lechuguilla* Torr. detectados por el método FRAP.

En la Figura 5 se muestra los resultados de la capacidad antioxidante total medida por el método del fosfomolibdeno, el cual se basa en la reducción de Mo (IV) a Mo (V) por el extracto, con la subsecuente formación del complejo fostato verdoso/Mo

(V) a pH ácido. Dicho modelo evalúa tanto la capacidad antioxidante de compuestos hidrosolubles como liposolubles, de ahí su nombre de capacidad antioxidante total (Aliyu *et al.*, 2012). Los registros indican que existe una relación entre el método de extracción y el solvente utilizado en la concentración de agentes antioxidantes en el licor resultante; es decir, que la extracción por el método con acetona concentró 1.75 mg de compuestos antioxidantes equivalentes a la  $\alpha$ -tocoferol, capaces de reducir el compuesto oxidante en la matriz de reacción.



**Figura 5.** Capacidad antioxidante de diferentes extractos de *Agave lechuguilla* Torr. detectados por el método Antioxidante Total.

Cada uno de los métodos aplicados evalúa el potencial antioxidante de una muestra biológica de diferentes maneras, y cada uno de ellos se basa en diversas reacciones. A pesar de que el ensayo de DPPH mostró poca diferencia en las tres diferentes

extracciones, existe una correlación entre los resultados de la capacidad antioxidante total y los ensayos de FRAP, en los que el extracto de acetona registró valores más altos comparados con los extractos de metanol y etanol. Esto significaría que, en las mismas condiciones, los compuestos antioxidantes de *A. lechuguilla* detectados tienen más afinidad con la acetona. Además, las condiciones de temperatura de las extracciones fueron favorables para la acetona, cuyo punto de ebullición es más bajo que el del metanol y el etanol; de tal manera que se generan mayores presiones de vapor en los recipientes, lo que conduce a mayores tasas de extracción gas-sólido.

El tratamiento con NaOH presentó, en general, valores de capacidad antioxidante más bajos, que el resto de las muestras. La diferencia para las muestras tratadas con solventes y la muestra con NaOH es atribuible a que el tiempo de operación fue superior, ya que en la literatura se cita que la extracción de este tipo de compuestos depende no solo la temperatura, si no del tiempo de contacto de las muestras herbáceas con el solvente (Ben Hamissa *et al.*, 2012); pese que para el tratamiento con NaOH, la temperatura y el tiempo de operación total del proceso fue mayor que los tratamientos con solventes, las reacciones en las que participan los antioxidantes extraídos de plantas son dependientes del pH, ya que el transporte de electrones está limitado en un ambiente saturado de  $-OH$ ; es decir, altamente oxidado, el cual tiende a degradar los compuestos fenólicos y a generar sustancias altamente oxidantes, debido a la deslignificación; es por ello que el licor resultante tendrá una capacidad antioxidante menor (Yokoyama *et al.*, 2007; Aliakbarian *et al.*, 2009).



## Conclusiones

La biomasa de *A. lechuguilla* presenta una composición característica de materiales herbáceos, los cuales contienen una menor cantidad de carbohidratos estructurales en comparación con muestras maderables. La biomasa contiene una cantidad de compuestos extractivos importante (>45 %), lo cual resulta de que la lechuguilla crece en condiciones áridas y de poca precipitación; por lo tanto, requiere de mecanismos de preservación en los que intervienen, de alguna manera, materiales como los compuestos antioxidantes o las grasas. Los licores resultantes de las extracciones con solventes presentan una cantidad considerable de compuestos antioxidantes, contenidos precisamente en la fracción de extractivos, lo cual abre nuevas posibilidades de estudio para este recurso forestal no maderable.

A pesar de que el tratamiento alcalino disminuye la capacidad antioxidante en los licores, este proceso de extracción de compuestos de alto valor agregado se puede acoplar al sistema de producción de biocombustibles como etanol de segunda generación (2G) y ajustarse a un modelo de biorrefinería. Sin embargo, para su aplicación se requieren de estudios más detallados y una evaluación de factibilidad técnico-económica.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa) y al Conacyt por el apoyo financiero otorgado.



## **Conflicto de Intereses**

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## **Contribución por Autor**

Juan E. Carmona: colaboración en cada una de las etapas del trabajo de investigación, desde el acondicionamiento, caracterización de la materia prima, extracción y determinación de antioxidantes en licores; Thelma K. Morales-Martínez: colaboración en la etapa de acondicionamiento y caracterización química de la materia prima por los métodos del Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL) y análisis por FTIR; Solange I. Mussatto: asesoría y análisis de resultados obtenidos de la etapa de extracción y cuantificación de actividad antioxidante, de acuerdo a los métodos utilizados; David Castillo-Quiroz: colaboración en la colecta, pretratamiento y caracterización de la materia prima, análisis de resultados y escritura del manuscrito; Leopoldo J. Ríos-González: asesoría y análisis de cada una de las etapas del trabajo de investigación y escritura del manuscrito.



## Referencias

- Abdel-Gawad, M. M., M. M. El-Sayed and E. S. Abdel-Hameed. 1999. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia* 70: 371-381.
- Adel, A. M., Z. H. A. El-Wahab, A. A. Ibrahim and M. T. Al-Shemy. 2010. Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis. *Bioresource Technology* 101:4446-4455.
- Aliakbarian, B., F. Dehghani and P. Perego. 2009. The effect of citric acid on the phenolic contents of olive oil. *Food Chemistry* 116: 617-623.
- Aliyu, A., M. Ibrahim, H. Ibrahim, A. Musa, A. Lawal, J. A. Oshanimi, M. Usman, I. E. Abdulkadir, A. O. Oyewale and J. Amupitan. 2012. Free radical scavenging and total antioxidant capacity of methanol extract of *Ethulia conyzoides* growing in Nigeria. *Romanian Biotechnological Letters* 17: 7458-7465.
- Almaraz-Abarca, N., M. D. S. González-Elizondo, M. D. G. Campos, Z. E. Ávila-Sevilla, E., A. Delgado-Alvarado and J. A. Ávila-Reyes. 2013. Variability of the foliar phenol profiles of the *Agave victoriae-reginae* complex (Agavaceae). *Botanical Sciences* 91: 295-306.
- Andrade-Cetto, A. and M. Heinrich. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 325-348.
- Ara, N. and H. Nur. 2009. *In vitro* antioxidant activity of methanolic leaves and flowers extracts of *Lippia alba*. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 4:107-110.
- Ávila-Fernández, Á., N. Galicia-Lagunas, M. E. Rodríguez-Alegría, C. Olvera and A. López-Munguía. 2011. Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry* 129: 380-386.

- Ben Hamissa, A. M., M. Seffen, B. Aliakbarian, A. A. Casazza, P. Perego and A. Converti. 2012. Phenolics extraction from *Agave americana* (L.) leaves using high-temperature, high-pressure reactor. Food and Bioproducts Processing 90: 17-21.
- Brackenbury, T. D. and C. C. Appleton. 1997. A comprehensive evaluation of *Agave attenuata*, a candidate plant molluscicide in South Africa. Acta Tropica 68: 201-213.
- Burda, S. and W. Oleszek. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 2774-2779.
- Castillo, Q. D., R. C. A. Berlanga y P. A. Cano. 2005. Recolección, extracción y uso de la fibra de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en el estado de Coahuila. CIR Noreste Centro. INIFAP. Publicación Especial Núm. 6. Saltillo, Coah., México. 13 p.
- Castillo, Q. D., A. O. Mares y G. E. E. Villavicencio. 2011. Lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) planta suculenta de importancia económica y social de las zonas áridas y semiáridas de México. Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas 8: 6-9.
- Castillo, Q. D., R. J. T. Sáenz, V. M. Narcia y R. J. A. Vázquez. 2013. Propiedades físico-mecánicas de la fibra de *Agave lechuguilla* Torr. de cinco procedencias bajo plantaciones. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 4: 78-91.
- Chen, P. Y., C. H. Chen, C. C. Kuo, T. H. Lee, Y. H. Kuo and C. K. Lee. 2011. Cytotoxic steroidal saponins from *Agave sisalana*. Planta Médica 77: 929-933.
- De Paula, M., T. Lacerda, M. Zambon and E. Frollini. 2012. Adding value to the Brazilian sisal: acid hydrolysis of its pulp seeking production of sugars and materials. Cellulose 19: 975-992.
- De Rodríguez, D. J., R. R. García, F. D. H. Castillo, C. N. A. González, A. S. Galindo, J. A. V. Quintanilla and L. E. M. Zuccolotto. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. Industrial Crops and Products 34: 960-966.

- Escamilla-Treviño, L. 2012. Potential of plants from the genus *Agave* as bioenergy crops. *BioEnergy Research* 5: 1-9.
- Garcia, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, Segunda Edición. Instituto de Geografía. UNAM. 146 p.
- García, M. D., A. M. Quílez, M. T. Sáenz, M. E. Martínez-Domínguez and R. de la Puerta. 2000. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 71: 395-400.
- García, M. D., M. T. Saenz, R. Puerta, A. Quilez and M. A. Fernandez. 1999. Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. *Fitoterapia* 70: 71-73.
- Hernández S., R., E. C. Lugo C., L. Díaz J. and S. Villanueva. 2005. Extraction and indirect quantification of saponins from the *Agave lechuguilla* Torrey. *e-Gnosis* 3: 1-9.
- Horwitz, W. and G. W. J. Latimer. 2005. Official methods of analysis of 729AOAC International. 18<sup>th</sup> ed. 730AOAC International. Gaithersburg, MD, USA. <http://www.eoma.aoac.org/> (20 de agosto de 2016).
- Idarraga, G., J. Ramos, V. Zuñiga, S. Turgut and Y. Raymond. 1999. Pulp and paper from blue agave wastes from Tequila production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4450-4455.
- Iñiguez-Covarrubias, G., R. Díaz-Teres, R. Sanjuan-Dueñas, J. Anzaldo-Hernández and R. Rowell. 2001. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: Potential value of *Agave tequilana* Weber *azul* leaves. *Bioresource Technology* 77: 101-108.
- Man, S., W. Gao, Y. Zhang, L. Huang and C. Liu. 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* 81: 703-714.

- Martins, S., C. N. Aguilar, J. A. Teixeira and S. I. Mussatto. 2012. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Separation and Purification Technology* 88: 163-167.
- Marroquín F., J. S., G. Borja L., R. Velásquez C. y J. A. De la Cruz C. 1981. Estudio ecológico dasonómico de las zonas áridas del norte de México. 2ª Edición. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Publicación Especial Núm. 2. México, D. F., México. 166 p.
- Meneses, N. G., S. Martins, J. A. Teixeira and S. I. Mussatto. 2013. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology* 108: 152-158.
- Mussatto, S. I. and I. C. Roberto. 2006. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81: 268-274.
- Mussatto, S. I., L. M. Carneiro, J. P. Silva, I. C. Roberto and J. A. Teixeira. 2011. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers* 83: 368-374.
- Narcia V., M., D. Castillo Q., J. A. Vázquez R. y C. A. Berlanga R. 2012. Turno técnico de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en el noreste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 3(9): 81-88.
- Narváez-Zapata, J. A. and L. F. Sánchez-Teyer. 2009. Agaves as raw material: recent technologies and applications. *Recent Patents Biotechnology* 3: 185-191.
- OriginLab®. 2016. Origin. Ver. 9.0. Origin Lab Corporation. MA, USA. n/p.
- Peana, A. T., M. D. Moretti, V. Manconi, G. Desole and P. Pippia. 1997. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of *Agave americana*. *Planta Medica* 63: 199-202.
- Pérez-Pimienta, J. A., H. M. Poggi-Varaldo, T. Ponce-Noyola, A. C. Ramos-Valdivia, J. A. Chávez-Carvayar, V. Stavila and B. A. Simmons. 2016. Fractional pretreatment



of raw and calcium oxalate-extracted agave bagasse using ionic liquid and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy* 91: 48-55.

Podolak, I., A. Galanty and D. Sobolewska. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochemistry Reviews* 9: 425-474.

Poletto, M., A. J. Zattera and R. Santana. 2012. Structural differences between wood species: Evidence from chemical composition, FTIR spectroscopy, and thermogravimetric analysis. *Journal of Applied Polymer Science* 126: 337-344.

Prieto, P., M. Pineda and M. Aguilar. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269: 337-341.

Sánchez, E., N. Heredia and S. García. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. *International Journal of Food Microbiology* 98: 271-279.

Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). 1996. "Norma Oficial Mexicana NOM-008- SEMARNAT-1996. Procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de cogollos.

[http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/Normas%20Oficiales%20Mexicanas%20vigentes/NOM\\_08\\_REC NAT.pdf](http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/Normas%20Oficiales%20Mexicanas%20vigentes/NOM_08_REC NAT.pdf) (20 de agosto 2016).

Singh, B., T. K. Bhat and B. Singh. 2003. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5579-5597.

Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton and D. Crocker. 2012. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Laboratory. Tech. Report. NREL/TP-510-42618. Golden, CO, USA. 15 p.

- Sluiter, A., R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter and D. Templeton. 2008. Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory. Tech. Report. TP-510-42619. Golden, CO, USA. 12 P.
- Sparg, S. G., M. E. Light and J. van Staden. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94: 219-243.
- Tropicos, 2017. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org> (21 de agosto 2016).
- Verástegui, Á., J. Verde, S. García, N. Heredia, A. Oranday and C. Rivas. 2008. Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1249-1252.
- Yokosuka, A. and Y. Mimaki. 2009. Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 70: 807-815.
- Yokoyama, T., Y. Matsumoto and G. Meshitsuka. 2007. Detailed examination of the degradation of phenol derivatives under oxygen delignification conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1301-1307.



## **Chemical, structural and functional properties of *lechuguilla* (*Agave lechuguilla* Torr.)**

Juan E. Carmona<sup>1</sup>

Thelma K. Morales-Martínez<sup>1</sup>

Solange I. Mussatto<sup>2</sup>

David Castillo-Quiroz<sup>3</sup>

Leopoldo J. Ríos-González<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. México.

<sup>2</sup> Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Technical University of Denmark, Kemitorvet, Building 220, 2800, Kongens Lyngby, Denmark.

<sup>3</sup> Campo Experimental Saltillo, CIRNE, INIFAP. México.

\*Autor por correspondencia, email: leopoldo.rios@uadec.edu.mx

**Abstract**

*Agave lechuguilla* Torr. Is a non-timber forest resource in the arid and semi-arid zones of northeastern Mexico, due to its range of distribution, it is interesting to evaluate the potential of this raw material for biotechnological applications such as the production of second generation biofuels and chemical products with high value added for the benefit of the people area rural. The objective of the present work was to evaluate the chemical, structural and functional properties of the biomass of *A. lechuguilla*, to determine its potential for obtaining antioxidants as products of high added value. The study of the material by Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM) confirmed the common characteristics of the lignocellulosic compounds of this type of materials. According to the chemical characterization, the main component were extractive compounds (45.34 %), followed by structural sugars such as cellulose and hemicellulose (34.87 %) and total lignin (7.32 %). The effect of different solvents (methanol, ethanol and acetone) and with NaOH in the preparation of antioxidant extracts was evaluated. All extracts showed antioxidant activity (DPPH, FRAP and CAT assays) with a better affinity for extraction and preservation with the use of acetone (89.75 % by DPPH, 1.60 mM Fe (II) g<sup>-1</sup> biomass by FRAP and 1.75 mg  $\alpha$ -tocopherol g<sup>-1</sup> biomass by CAT). The results reveal the potential of *A. lechuguilla* for the extraction of antioxidants as products of interest in the pharmaceutical and food industry.

**Key words:** *Agave lechuguilla* Torr., chemical composition, structural characteristics, functional properties, antioxidants.

Fecha de recepción/ Reception date: 10 de abril de 2017.

Fecha de aceptación/ Acceptance date: 6 de mayo de 2017.

## Introduction

Various *agave* species have shown --both *in vitro* and *in vivo*-- antimicrobial and antifungal (García *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2005; Verástegui *et al.*, 2008; De Rodríguez *et al.*, 2011), antiinflammatory (Peana *et al.*, 1997; García *et al.*, 2000), antioxidant (Singh *et al.*, 2003; Ben Hamissa *et al.*, 2012), molluscicide (Brackenbury and Appleton, 1997; Abdel-Gawad *et al.*, 1999), antidiabetic (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005) and cytotoxic activity against certain cancer cell lines (Yokosuka and Mimaki, 2009; Man *et al.*, 2010; Podolak *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). These properties are attributed to certain phytochemicals such as saponins, sapogenins, phenolic compounds and fructans. In addition to the beneficial properties mentioned above, the saponins of various plants are antiparasitic, antiviral, antioxidant, antiulcerogenic, immunomodulatory, hepatoprotective, neuroprotective, antimutagenic, antispasmodic, with lipid-lowering effects, healing action on wounds and hypocholesterolemic activities (Sparg *et al.*, 2004).

In addition, the hydrolysis of fructans may be a source of prebiotic oligossacharides (Ávila-Fernández *et al.*, 2011) and monossacharides such as glucose and fructose. Because fructans are the main reserve of water-soluble carbohydrates of agaves, they are the main component of several species (35 % to 70 % on a dry weight basis), and because their hydrolysis releases 80 % to 86 % of fructose and 10 % to 15 % of glucose, they are used for the production of syrups —one of the most recent applications of these plants (Escamilla-Treviño, 2012).

Although fresh leaves represent approximately 25 % of the plant (on a wet basis), such materials are not utilized (Íñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001), as their non-structural sugar content is lower than that of the central part of the individual,



traditionally known as the head or pine; however, the leaves can be used for the extraction of fiber, or in the production paper or of biofuels like ethanol (Paula *et al.*, 2012; Idárraga *et al.*, 1999; and Narváez-Zapata and Sánchez-Teyer, 2009).

*Lechuguilla* (*Agave lechuguilla* Torr., *Asparagaceae*) (Tropicos, 2017) is a non-timber forest resource; it is a native taxon of the arid and semi-arid areas in the south of the United States of America and the northeast of Mexico (Castillo *et al.*, 2011). Its national distribution area covers a surface area of approximately 20 million hectares and comprises the states of *Coahuila*, *Chihuahua*, *Nuevo León*, *Durango*, *San Luis Potosi*, *Tamaulipas* and *Zacatecas* (Castillo *et al.*, 2011).

*A. lechuguilla* provides significant socioeconomic benefits to the inhabitants of rural areas, since the extraction of its fiber has been a family subsistence activity for more than 70 years and generates direct employment (Castillo *et al.*, 2013), in addition to the advantages brought by the commercialization of the obtained raw material (Castillo *et al.*, 2011), whose transformation results in various products, including brushes for industrial and domestic use; its main market is international: 93 % of its production is exported, mainly to the United States of America, the Netherlands, Switzerland and Honduras (Castillo *et al.*, 2011), with Mexico as the sole exporter.

Traditionally, the fiber of lechuguilla is obtained from the bud, which is composed of the tenderest leaves of the plant, grouped at its center (Castillo *et al.*, 2005; Narcia *et al.*, 2012); this fiber has less woodiness than that of the lateral leaves. At present, its use in the field is related to high levels of marginalization. It is therefore necessary to look for new alternatives to the extraction of fiber, such as the obtainment of chemical products with added value, which would provide an opportunity to improve the quality of life of the inhabitants of the arid and semi-arid areas, where this species thrives.

Given the limited information on the use of *Agave lechuguilla* for biotechnological applications (Hernández *et al.*, 2005; Almaraz-Abarca *et al.*, 2013), the aim of the present study was to assess the chemical, structural, and functional properties of its

biomass in order to determine its potential for the extraction of antioxidants as chemical products of high added value.

## **Materials and Methods**

### **Harvesting of the raw material and preparation of samples**

According to the Official Mexican Standard NOM-008-SEMARNAT-1996, which limits the use of the bud of *Agave lechuguilla* Torr., samples from natural populations were collected during the month of March at the Paredón *ejido* in the municipality of *Ramos Arizpe, Coahuila, Mexico* (25°55'47 "N 101°55'47" W), located at an altitude of 728 m, with a mean annual temperature of 33 °C, and a mean annual precipitation of 269 mm; its climate is very dry or semi-warm desert, with a cool winter (García, 1973), and its vegetation type is rosetophilous desert shrub (Marroquín *et al.*, 1981).

The collected samples were washed with tap water in order to remove dirt and other impurities. Once dry, they were cut by hand to a size of approximately 1- 2 cm<sup>2</sup>, and placed in a Koeff-KL10 convection oven until a moisture level of <10 % (p/p) was reached. The dehydrated samples were ground in a Retsch cutting -SM100 mill to a mean particle size of 2 mm. The sample thus obtained was homogenized and stored in plastic containers at room temperature.

### **Determination of the chemical composition**

The extractive determination was performed according to Sluiter *et al.* (2008), using ultrapure water and absolute ethanol as solvents in two sequential stages. The cellulose, hemicellulose and lignin were extracted using the procedures of the National Renewable Energy Laboratory (Sluiter *et al.*, 2012), with a modification

(Mussatto *et al.*, 2011): 500 mg of the material was hydrolyzed using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 72 % (p/p), during 7 minutes at 50 °C. Subsequently, the hydrolyzate was diluted to 4 % (p/p) with distilled water. A second hydrolysis was carried out by autoclaving the reaction mixture at 121 °C for 1 h; the resulting solution was sieved through 0.2- $\mu$ m filters, and the liquid fraction was analyzed with HPLC in order to determine the levels of glucose (cellulose), arabinose, galactose, mannose and xylose (hemicellulose), according to Mussatto and Roberto (2006).

The content of acid-soluble (ash-free) lignin was calculated as described by Mussatto and Roberto (2006). The solid fraction recovered after filtration is considered to be acid-insoluble lignin. The total lignin value was calculated based on the total amount of acid-insoluble and soluble lignin.

The ash content was estimated through incineration of the samples at 550 °C for 4 h (Horwitz and Latimer, 2005).

### **Antioxidant potential**

The extracts (liquors) of *A. lechuguilla* were obtained using 2 grams (on a dry basis) of the sample with 40 mL of each solvent: 1) methanol, 2) ethanol and 3) acetone at 60 % (v/v) in all three cases. Each treatment was carried out at a temperature range of 60 to 65 °C, during 90 min with magnetic agitation. The control consisted in the same amount of sample subjected to treatment in an autoclave at 120 °C for 90 min, with 40 mL of NaOH at 2 %. The four extracts were then separated by centrifugation at 2 500 rpm for 20 min and sieved through 0.22  $\mu$ m filters.

The antioxidant capacity of the extracts was determined by two spectrophotometric methods: the stable free radical assay (DPPH) and the ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) were adapted for a 96-well microplate (Martins *et al.*, 2012). The total antioxidant capacity (TAC) was evaluated using the method described by Prieto *et al.* (1999).

## Structural characterization

The FTIR spectra were recorded with the FTIR spectrometer (Agilent, Cary 630, USA); the FTIR in the band mode of absorption were in the range of 650-4 000  $\text{cm}^{-1}$ , with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  and 32 explorations. Consecutively, the resulting FTIR spectra were analyzed and standardized and are represented in the software Origin (OriginLab®, 2016)

## Surface morphology

*A. lechuguilla* particles were observed using scanning electron microscopy (SEM), in a microscope with a field-emission electron gun at an ultra-high resolution (Nova 200 Nano SEM, FEI Company). Prior to the analysis, the samples were covered with a thin film (35 nm) of Au-Pd (80-20 % by weight). The images were obtained by applying a voltage of 10 kV acceleration, with increases of 200 and 2 000.

## Analysis

All the experiments were made in triplicate and the recorded values represent the mean for each treatment, with its corresponding standard deviation.



## Results and Discussion

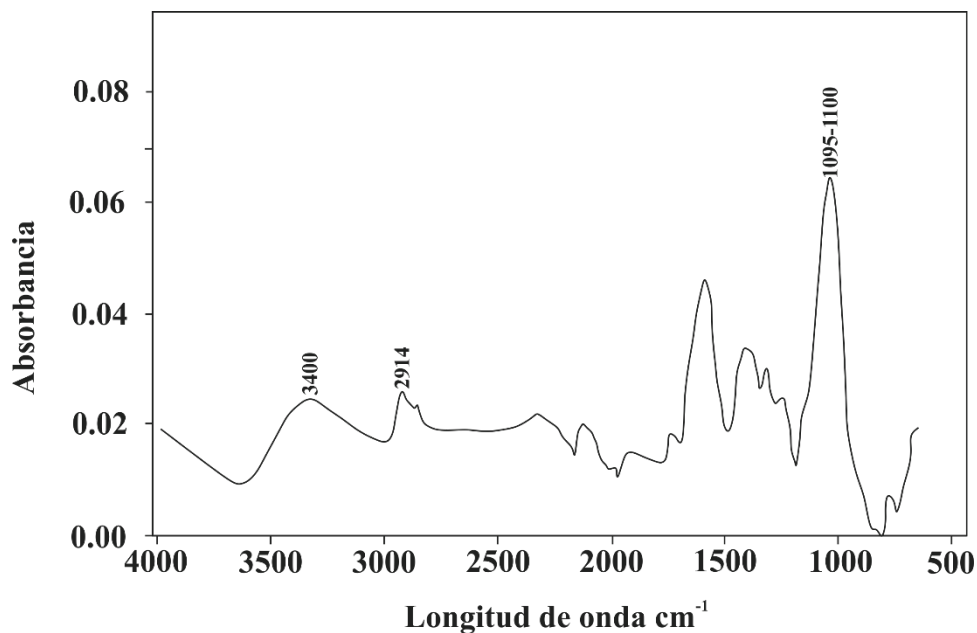
### Chemical Groups and Bonding Layout of the Components

The FTIR analysis confirmed that the buds of *A. lechuguilla* have absorption bands that are typical of lignocellulosic materials, although their magnitudes differ (Adel *et al.*, 2010).

Because of their complex nature, their FTIR spectra are often separated into two main sections; -OH and -CH, which extend through the region of 3 800-2 700  $\text{cm}^{-1}$ , and the digital fingerprint region that is assigned to the stretching vibrations of various groups of components of these lignocellulosic materials to 1 800-800  $\text{cm}^{-1}$  (Poletto *et al.*, 2012).

The broad peak between 3 400  $\text{cm}^{-1}$  is related to the O-H stretching vibrations of the hydroxyl group. The signals between 2 920  $\text{cm}^{-1}$  and 2 850  $\text{cm}^{-1}$  are commonly observed in samples of lignocellulosic biomass and correspond to the methyl and methylene groups (-CH<sub>3</sub> and CH<sub>4</sub>), respectively. However, for *A. lechuguilla* samples these signs appeared at 2 914  $\text{cm}^{-1}$ , which may be due to the greater extractive content of this raw material, as some compounds in organic extractives, such as methyl esters of fatty acids and esters of phenolic acid, contain methyl and methylene groups (Poletto *et al.*, 2012).

The signals recorded at 1 735  $\text{cm}^{-1}$ , 1 375  $\text{cm}^{-1}$ , 1 240  $\text{cm}^{-1}$ , 1 165  $\text{cm}^{-1}$  and 1 060  $\text{cm}^{-1}$  are characteristic of the stretching and twisting of various groups of carbohydrates. For the *A. lechuguilla* bands attributable to symmetric and asymmetric stretching of the C-O-C in glycosidic bonds, they occurred at 1 100  $\text{cm}^{-1}$  and 1 095  $\text{cm}^{-1}$  and correspond to the  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds that unite the glucose units in cellulose and hemicellulose (Figure 1).

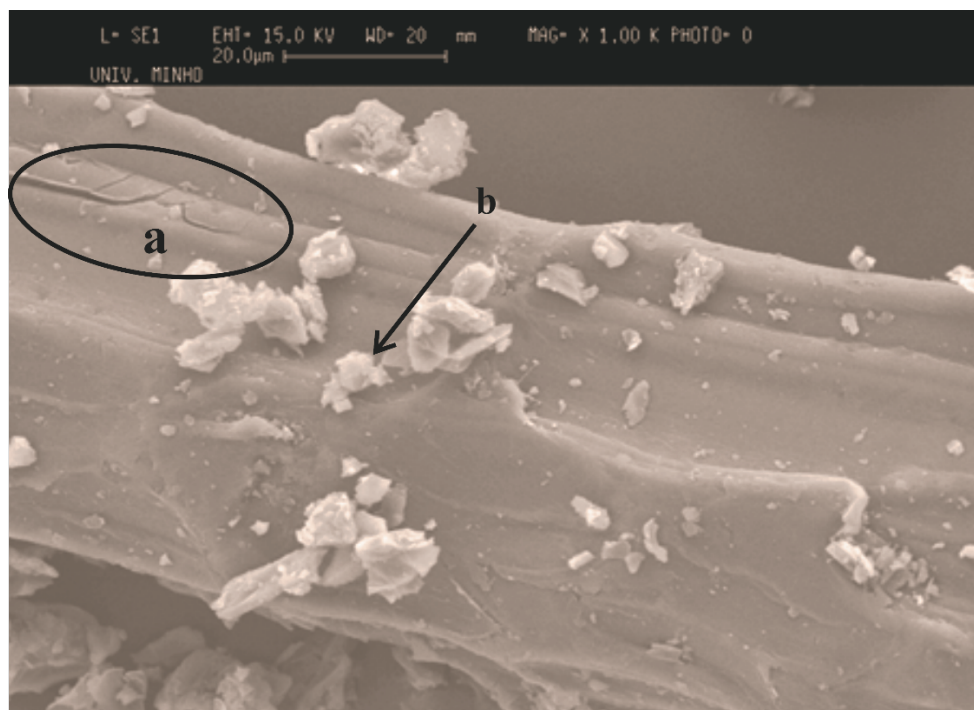


**Figure 1.** FTIR spectrum of the bud of *Agave lechuguilla* Torr.

## Surface morphology

The images obtained using scanning electron microscopy revealed a rigid structure in *A. lechuguilla* (Figure 2). The small fractures observed can be attributed to the milling process (Figure 2a), and the small crystalline forms (Figure 2b) would be small crystals of calcium oxalate, commonly present in this type of biomass (Pérez-Pimienta *et al.*, 2016).





a) Fractures of the fibers; (b) crystalline forms present in the material.

**Figure 2.** Electron micrographs by scanning electron microscopy (SEM) of crushed leaves of *Agave lechuguilla* Torr.

## Chemical composition

After the elimination of the extractive compounds, the material lost 45.34 % of its original weight, which corresponds to the non-structural components such as sucrose, nitrate/nitrites, protein, ash, chlorophyll, and fatty compounds of the plant (Sluiter *et al.*, 2012).

The relative moisture of the material, after the drying process, was 4.33 %. The cellulose fraction was calculated based on the glucose detected using HPLC (0.55 g L<sup>-1</sup>). The hemicellulose was determined on the basis of the concentration of xylose (0.22 g L<sup>-1</sup>), galactose (0.18 g L<sup>-1</sup>), arabinose (0.068 g L<sup>-1</sup>) and mannose (0.08 g L<sup>-1</sup>).



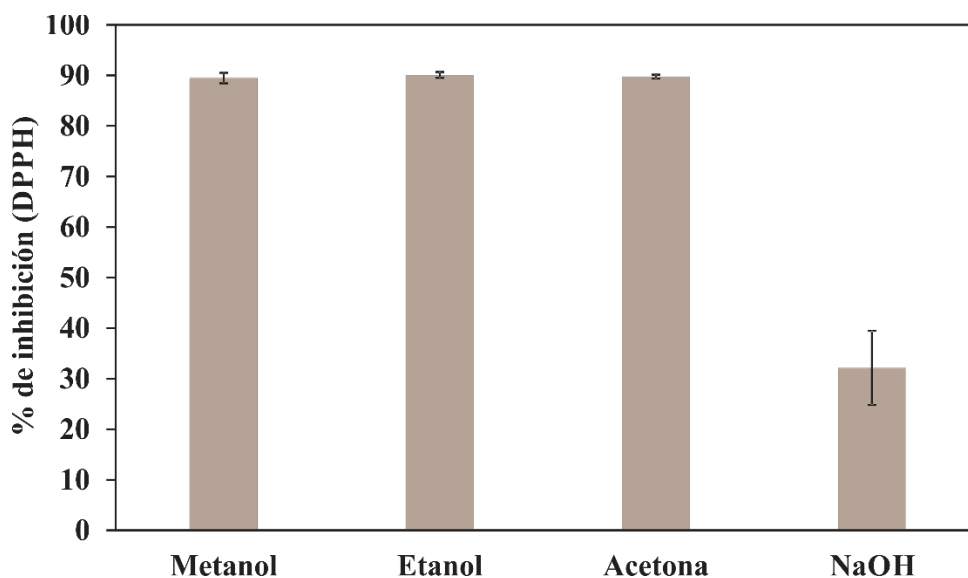
<sup>1</sup>). The cellulose, hemicellulose, and lignin contents (dry basis) in the samples were 17.72 %, 17.15 and 7.32 %, respectively (Table 1).

**Table 1.** Chemical composition of *Agave lechuguilla* Torr.

Chemical component	Composition (% Dry Basis)
Cellulose	17.72 ± 0.68
Hemicellulose	17.15 ± 0.91
Soluble lignin	3.64 ± 0.34
Insoluble lignin	3.68 ± 0.21
Ashes	12.45 ± 0.88
Extractives	45.34 ± 1.2

### Antioxidant potential

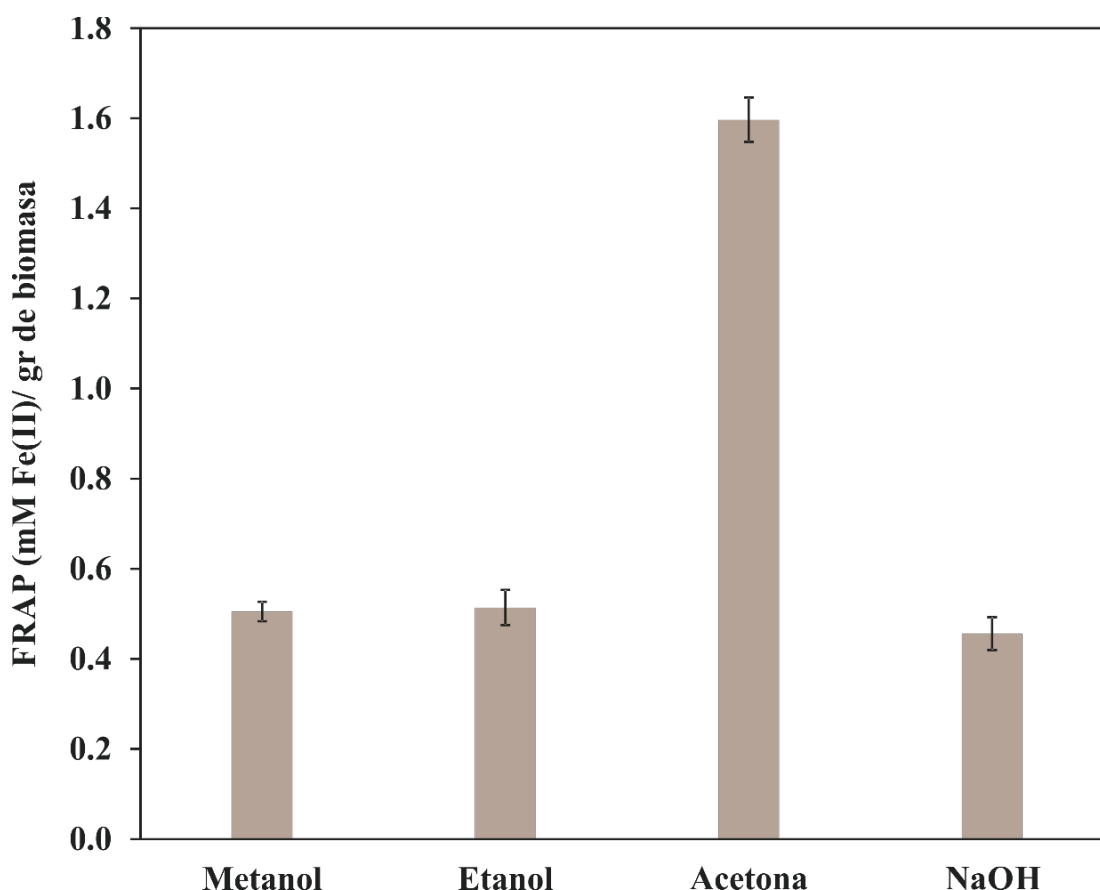
The antioxidant potential of *A. lechuguilla* was assessed using three of the most common testing methods (DPPH, FRAP and CAT). DPPH has been widely used as a fast, reliable and reproducible parameter to measure the in vitro antioxidant capacity of pure compounds as well as extracts from plants (Gross and Oleszek, 2001; Ara and Nur, 2009). The results of the assay DPPH are shown in Figure 3; the values are provided in terms of % of inhibition by DPPH. It is evident that the treatments with solutions of methanol, ethanol and acetone were of the order of 89.47 %, 90.09 % and 89.75 %, respectively; while the liquor from the treatment with NaOH had a low DPPH value (32.148 %) (Figure 3).



**Figure 3.** Percentage of inhibition by DPPH reagent of different extracts of *Agave lechuguilla* Torr.

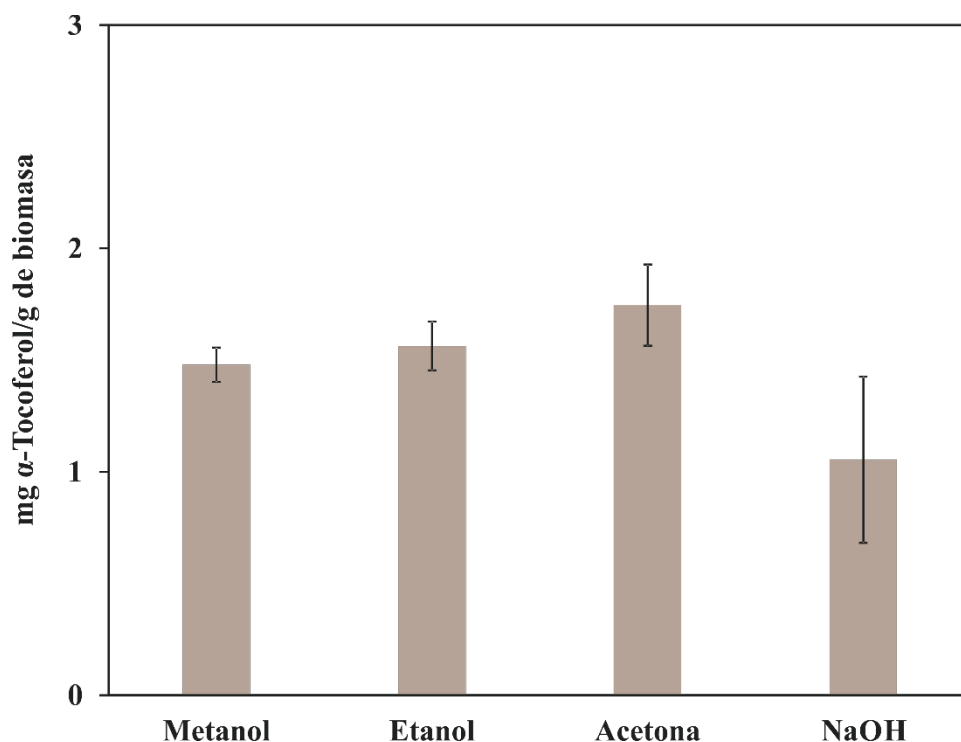
The results expressed in  $\text{mM Fe(II) g}^{-1}$  biomass (on a dry basis) were 0.51, 0.51, 1.6 and 0.46, respectively, for the extracts obtained through treatment with methanol, ethanol, acetone and NaOH respectively.

Although the solutions used in the treatments are binary water-solvent mixtures, not all have the same physical-chemical characteristics, since the polarity of each solvent (or mixture of these) has a direct relationship to the amount and quality of antioxidant compounds that can be extracted by it (Aliyu *et al.*, 2012). The order of hierarchy in terms of polarity for this work is Acetone > Methanol > Ethanol. This is related to the concentration of antioxidants detected using the FRAP method in liquors resulting from the extractions with solvents, as the highest concentration was obtained with the acetone method ( $1.60 \text{ mM Fe(II) g}^{-1}$  of biomass), and the values of the liquors obtained with methanol and ethanol, both of which exhibit a very similar polarity, were  $0.51 \text{ mM Fe(II) g}^{-1}$  of biomass. Finally, although no solvent was used to extract it, the biomass treated with NaOH had a value of  $0.46 \text{ mM Fe(II) g}^{-1}$  because a fraction of antioxidant compounds were extracted by virtue of the interaction of the temperature used and the water present in the solution.



**Figure 4.** Antioxidant capacity of various extracts of *Agave lechuguilla* Torr. detected using the FRAP method.

Figure 5 shows the results for the total antioxidant capacity measured with the phosphomolybdenum method, which is based on the reduction of Mo (IV) to Mo (V) for the extract, with the subsequent formation of the green phosphate Mo (V) complex at an acidic pH. This model evaluates the antioxidant capacity of both water-soluble and fat-soluble compounds, hence the name "total antioxidant capacity" (Aliyu *et al.*, 2012). The records indicate that there is a relationship between the method of extraction and the solvent used in the concentration of antioxidants in the resulting liquor; that is to say, that the extraction using the acetone method concentrated 1.75 mg of antioxidant compounds equivalent to  $\alpha$ -tocopherol, which are capable of reducing the oxidant compound in the reaction matrix.



**Figure 5.** Antioxidant capacity of various extracts of *Agave lechuguilla* Torr. detected using the Total Antioxidant method.

Each of the applied methods evaluates the antioxidant potential of a biological sample in different ways, and each one of these is based on a variety of reactions. Despite the fact that the DPPH assay showed little difference in the three different extractions, there is a correlation between the results of the total antioxidant capacity and testing with FRAP, in which the acetone extract exhibited higher values than the methanol and ethanol extracts. This would mean that, under the same conditions, the antioxidant compounds detected in *A. lechuguilla* have more affinity with acetone. Furthermore, the temperature conditions of the extractions were favorable for the acetone, whose boiling point is lower than that of methanol and ethanol; thus, higher vapor pressures are generated in the containers, which leads to higher gas-solid extraction rates.

Lower antioxidant capacity values were obtained for the sample treated with NaOH than for all the other samples. The difference between the samples treated with

solvents and the sample treated with NaOH may be attributed to the longer operation time allotted to the former, as, according to the literature, the extraction of this type of compounds depend not only on the temperature but also on the time during which the herbaceous samples are in contact with the solvent (Ben Hamissa *et al.*, 2012). While for the treatment with NaOH, the temperature was higher and the total operation time of the process was longer than for the treatments with solvents, the reactions involving antioxidants extracted from plants are pH dependent, as electron transport is limited in a highly oxidized environment —i.e. in an environment saturated with OH—, which tends to degrade phenolic compounds and to generate highly oxidizing substances due to delignification; therefore, the resulting liquor will have a lower antioxidant capacity (Yokoyama *et al.*, 2007; Aliakbarian *et al.*, 2009).

## Conclusions

The composition of *A. lechuguilla* biomass is characteristic of herbaceous materials, which contain a smaller amount of structural carbohydrates than timber samples. The biomass of *A. lechuguilla* contains a significant number of extractive compounds (>45 %) because this species grows in arid conditions with scarce precipitation; therefore, it requires preservation mechanisms involving in some way such materials as antioxidant compounds or fats. The liquors resulting from the extractions with solvents have a considerable amount of antioxidant compounds, contained precisely in the fraction of extractives —a finding that opens up new possibilities of study for this non-timber forest resource.

Although the alkaline treatment decreases the antioxidant capacity of the liquors, this process for the extraction of compounds with a high added value can be adapted to the system for the production of biofuels like second-generation ethanol

(2G) and conform to a biorefinery model. However, its application will require further, more detailed studies and a technical-economic feasibility assessment.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*, Sagarpa (Department of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food) and the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*, Conacyt (National Council for Science and Technology) for the financial support granted.

### **Conflict of interests**

The authors declare no conflict of interests.

### **Contribution by author**

Juan E. Carmona: collaboration at every stage of the research from the preparation, characterization of the raw material, extraction and determination of antioxidants in the liquors; Thelma K. Morales-Martínez: collaboration at the preparation stage, and chemical characterization of the raw material using the methods of the National Renewable Energy Laboratory (NREL) and analysis by FTIR; Solange I. Mussatto: counseling and analysis of results obtained at the extraction stage and quantification of antioxidant activity according to the methods used; David Castillo-Quiroz: collaboration in the collection, pretreatment and characterization of the raw material, analysis of results and drafting of the manuscript; Leopoldo J. Ríos-González: counseling and analysis of every stage of the research work and drafting of the manuscript.